

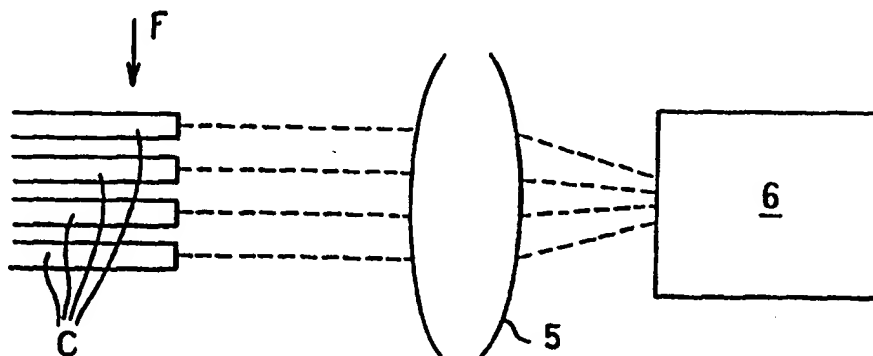


DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPÉRATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁶ : G01N 27/447	A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 99/39192 (43) Date de publication internationale: 5 août 1999 (05.08.99)
<p>(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR99/00184</p> <p>(22) Date de dépôt international: 29 janvier 1999 (29.01.99)</p> <p>(30) Données relatives à la priorité: 98/01091 30 janvier 1998 (30.01.98) FR</p> <p>(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (CNRS) [FR/FR]; 3, rue Michel-Ange, F-75794 Paris Cedex 16 (FR).</p> <p>(72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): SIEBERT, Rainer [DE/FR]; 6, rue du Docteur Vaillant, F-78340 Les Clayes-sous-Bois (FR). BOTTANI, Samuele [CH/FR]; 4, villa des Gobelins, F-75013 Paris (FR). REBSCHER, Hans [DE/FR]; 10, résidence La Vaucouleur, F-91940 Les Ulis (FR). VALENTIN, Luc [FR/FR]; 36, rue Gometz, F-91440 Bures (FR).</p> <p>(74) Mandataires: MARTIN, Jean-Jacques etc.; Cabinet Regimbeau, 26, avenue Kléber, F-75116 Paris (FR).</p>	<p>(81) Etats désignés: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).</p> <p>Publiée Avec rapport de recherche internationale. Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si des modifications sont reçues.</p>	

(54) Title: IMPROVEMENTS TO MULTIPLE CAPILLARY ELECTROPHORESIS SYSTEMS

(54) Titre: PERFECTIONNEMENTS AUX SYSTEMES D'ELECTROPHORESE MULTICAPILLAIRES



(57) Abstract

The invention concerns a multiple capillary electrophoresis system comprising a plurality of juxtaposed capillaries, at least one source for transmitting a beam designed to excite the molecules present on its path and inside the capillaries, means for detecting the fluorescence of the molecules excited by said beam. The invention is characterised in that said means are arranged so as to detect the light emerging at the output of said capillaries and propagated along a direction wherein said capillaries extend and the detection means resolution is sufficient for distinguishing the light emerging at the output of the capillaries from that coming from the walls thereof and/or their surrounding medium.

(57) Abrégé

Système d'électrophorèse multicapillaire comportant une pluralité de capillaires juxtaposés, au moins une source pour l'émission d'un faisceau destiné à exciter des molécules se trouvant sur son trajet et à l'intérieur des capillaires, des moyens pour détecter la fluorescence des molécules excitées par ledit faisceau, caractérisé en ce que lesdits moyens sont agencés de façon à réaliser une détection de la lumière qui émerge en sortie desdits capillaires et qui se propage selon la direction dans laquelle lesdits capillaires s'étendent et en ce que la résolution des moyens de détection est suffisante pour distinguer la lumière qui émerge en sortie des capillaires de celle venant des parois de ceux-ci et/ou du milieu qui les entoure.

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	ML	Mali	TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	MN	Mongolie	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MR	Mauritanie	UA	Ukraine
BR	Brazil	IL	Israël	MW	Malawi	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MX	Mexique	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	NE	Niger	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NL	Pays-Bas	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norvège	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NZ	Nouvelle-Zélande	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	PL	Pologne		
CM	Cameroun	KR	République de Corée	PT	Portugal		
CN	Chine	KZ	Kazakhstan	RO	Roumanie		
CU	Cuba	LC	Sainte-Lucie	RU	Fédération de Russie		
CZ	République tchèque	LI	Liechtenstein	SD	Soudan		
DE	Allemagne	LK	Sri Lanka	SE	Suède		
DK	Danemark	LR	Libéria	SG	Singapour		
EE	Estonie						

PERFECTIONNEMENTS AUX SYSTEMES D'ELECTROPHORESE
MULTICAPILLAIRES

La présente invention est relative aux systèmes d'électrophorèse
5 multicapillaires.

On sait que les techniques d'électrophorèse en gel classiques, dans
lesquelles on injecte différents échantillons sur une pluralité de pistes
définies dans un gel compris entre deux plaques, ne sont pas
satisfaisantes, étant donné d'une part qu'elles nécessitent un certain
10 nombre d'opérations manuelles et d'autre part qu'elles ne permettent pas
des vitesses de migration et donc des débits de traitement très importants.

Or les grands programmes de séquençage et de génotypage
nécessitent un débit très élevé de séparation et d'identification des
molécules d'ADN.

15 On connaît par ailleurs des techniques d'électrophorèse utilisant pour
la migration un capillaire rempli de gel ou d'une autre matrice de séparation
présentant l'avantage d'être particulièrement maniable, facile à charger et
de permettre un fonctionnement sensiblement automatique, avec des
vitesses de séparation plus élevées que dans l'électrophorèse en plaques
20 de gel grâce à un champ électrique applicable important.

Toutefois, l'utilisation d'un seul capillaire ne permet pas d'atteindre
les mêmes débits que ceux que permettent les techniques d'électrophorèse
en plaques qui possèdent de nombreuses pistes en parallèle, même si
néanmoins les champs électriques qui peuvent être appliqués à un
25 capillaire, et donc les vitesses de migration obtenues, sont importants.

C'est pourquoi il a également été proposé des systèmes dits
multicapillaires comportant une barrette de plusieurs capillaires juxtaposés.

On connaît notamment des systèmes d'électrophorèse
multicapillaires dans lesquels le faisceau laser d'excitation des molécules
30 est envoyé sur celles-ci au travers des parois des capillaires, selon un axe
dans le plan de la barrette, perpendiculaire à la direction selon laquelle les
capillaires s'étendent, la fluorescence des molécules étant observées par

des moyens de réception présentant un axe optique perpendiculaire au plan de la barrette des capillaires.

On pourra par exemple à cet égard se référer à la publication :

" A capillary Array Gel Electrophoresis System Using Multiple Laser Focusing
5 for DNA Sequencing " – T. Anazawa, S. Takahashi, H. Kambara – Anal.
Chem. – Vol. 68, N°15, - 1^{er} Août 1996 – p. 2699-2704.

Toutefois, une telle technique est peu satisfaisante compte tenu du
bruit de détection résultant de l'interaction de la lumière d'excitation et de la
fluorescence des parois du capillaire. En outre, le faisceau laser perd en
10 intensité au fur et à mesure qu'il traverse les capillaires, de sorte que les
molécules qui se trouvent dans les capillaires les plus éloignés de la source
laser sont moins excitées que celles qui se déplacent dans les premiers
capillaires.

Du fait de ces inconvénients majeurs, on préfère généralement aux
15 systèmes d'électrophorèse multicapillaires dans lesquels le faisceau laser
d'excitation des molécules est envoyé sur celles-ci au travers des parois
des capillaires, les systèmes du type de ceux décrits dans la publication:

" Analysis of Nucleic Acids by Capillary Electrophoresis. " – C. Heller – p.
236 à 254 - Editions Vieweg – 1997

20 ou encore dans les brevets et demandes de brevet US-5 567 294 ou EP-
723 149.

Dans les systèmes décrits dans cette publication ou ces brevets, les
capillaires sont maintenus les uns par rapport aux autres dans une cuvette
en verre dans laquelle lesdits capillaires s'étendent. Les molécules qui
25 traversent les capillaires sont excitées après être sorties desdits capillaires
par un rayonnement laser qui est envoyé, juste en sortie de la barrette,
dans le plan de ladite barrette et perpendiculairement à la direction selon
laquelle les capillaires s'étendent.

La fluorescence des molécules excitées par ce rayonnement est
30 détectée au moyen par exemple d'une caméra CCD qui est orientée avec
un axe perpendiculaire au plan de la barrette de capillaires ou encore avec
un axe parallèle aux capillaires.

Cependant, un tel système oblige à prévoir des moyens tels que des flux laminaires ou des éléments de guidage empêchant que les molécules en sortie des différents capillaires ne divergent de façon trop importante. Pour cela, la cuvette nécessite une réalisation mécanique de haute
5 précision dans du verre. En particulier, le dispositif devra permettre d'assurer un flux très régulier et éviter toute bulle de gaz ou poussière venant perturber le flux.

En outre, cette technique nécessite d'utiliser des matériaux différents – au moins en ce qui concerne la viscosité – pour les capillaires et la
10 cuvette qui ont des fonctions distinctes, l'un servant à la séparation des molécules, l'autre à la canalisation des flux. L'utilisation de volumes importants de solutions pour réaliser le flux devient alors nécessaire.

Comme on l'aura compris, une telle technique présente l'inconvénient d'être particulièrement onéreuse.

15 Un but de l'invention est donc de proposer un système d'électrophorèse multicapillaire qui, pour des applications chimiques et pharmaceutiques, est robuste, peu cher, fiable, facile d'utilisation, et présente des performances permettant un séquençage et un génotypage à haut débit.

20 A cet effet, l'invention propose un système d'électrophorèse multicapillaire comportant une pluralité de capillaires juxtaposés, au moins une source pour l'émission d'un faisceau destiné à exciter des molécules se trouvant sur son trajet et à l'intérieur des capillaires, des moyens pour détecter la fluorescence des molécules excitées par ledit faisceau.

25 Pour palier les inconvénients qui dans les systèmes connus dans l'état de la technique éloignaient l'homme du métier de ce type de système, l'invention propose d'agencer les moyens de détection de façon à réaliser une détection de la lumière qui émerge en sortie desdits capillaires et qui se propage selon la direction dans laquelle lesdits capillaires s'étendent, ainsi
30 que d'utiliser des moyens de détection ayant une résolution suffisante pour distinguer la lumière qui émerge en sortie des capillaires de celle venant des parois de ceux-ci et/ou du milieu qui les entoure.

Une telle structure permet une détection des molécules à l'intérieur des capillaires tout en réduisant considérablement le bruit de détection.

Ce système est avantageusement complété par les différentes caractéristiques avantageuses suivantes prises seules ou selon toutes leurs

5 combinaisons techniquement possibles :

- il comporte une matrice de capillaires ;
- il comporte des moyens, tels que des microlentilles, pour réaliser une focalisation multiple sur une barrette de capillaires ;

10 - une barrette de capillaires réalise une focalisation multiple en entrée de la barrette suivante ;

- le faisceau d'excitation est de section allongée et attaque simultanément plusieurs capillaires superposés ;

15 - l'espace entre les capillaires est rempli, au moins sur la trajectoire du faisceau d'excitation, par un matériau dont l'indice de réfraction est choisi pour que le faisceau d'excitation ne diverge pas après avoir traversé un capillaire ;

- ledit matériau est transparent et non fluorescent ;

- il comporte des moyens pour appliquer dans la cuvette de détection, une pression qui permet de remplir les capillaires avec la matrice de séparation ;

20 - il comporte des moyens de dispersion pour séparer spatialement les différentes longueurs d'onde de fluorescence ;

- les moyens de détection relèvent une image complète de la lumière en sortie des capillaires ;

25 - les moyens de détection comportent des moyens de détection du type à transfert de charge (CCD), ainsi que des moyens de focalisation ;

- les moyens de détection comportent des moyens de détection du type à transfert de charge (CCD), ainsi qu'un faisceau de fibres interposé entre les sorties des capillaires et les moyens de détection du type à transfert de charge.

30 D'autres caractéristiques et avantages de l'invention ressortiront encore de la description. Cette description est purement illustrative et non limitative. Elle doit être lue en regard des dessins annexés sur lesquels :

- la figure 1 est une représentation schématique en perspective d'un système conforme à un mode de réalisation possible de l'invention ;
- 5 - la figure 2 est une représentation schématique en illustrant la disposition des moyens de détection par rapport aux capillaires pour le système de la figure 1 ;
- les figures 3a et 3b illustrent l'utilisation d'un faisceau d'excitation de section droite circulaire ;
- les figures 4a et 4b illustrent l'utilisation d'un faisceau de section droite elliptique ;
- 10 - la figure 5 illustre l'utilisation d'une matrice de capillaires ;
- les figures 6a et 6b illustrent deux variantes possibles pour le montage des capillaires ;
- les figures 7a et 7b sont deux photographies illustrant la répartition du faisceau d'excitation après avoir traversé des capillaires, selon l'indice du milieu qui environne les capillaires et qui est traversé par ledit faisceau d'excitation ;
- 15 - la figure 8 est un graphe sur lequel on a porté la réponse du système en fonction d'une concentration de fluorescéine ;
- 20 - la figure 9 est un graphe sur lequel on a porté le rapport signal/bruit par capillaire ;
- la figure 10 est un graphe sur lequel on a porté le rapport signal/bruit en fonction de la puissance du laser, pour trois concentrations de fluorescéine différentes ;
- 25 - la figure 11 est un graphe sur lequel on a porté l'intensité du rapport signal/bruit en fonction de l'ouverture de l'objectif ;
- la figure 12a est un graphe sur lequel on a porté l'intensité collectée en fonction du temps pour un exemple de séparation d'échantillons mis en œuvre avec le système illustré sur la figure
- 30 1 ;
- la figure 12b est un graphe sur lequel on a porté en fonction du temps l'intensité collectée pour un exemple de séparation d'ADN mis en œuvre avec le système illustré sur la figure 1.

Le système d'électrophorèse multicapillaire représenté sur la figure 1 comporte, sur une table optique 1 :

- un canal 3 dans lequel s'étendent des capillaires,
- une boîte à haute tension 2 avec chauffage sur laquelle sont montées les entrées des capillaires et sur laquelle est intégré un système de régulation de température,
- une cellule de détection 4 disposée en sortie du canal 3,
- une caméra CCD 6 et une optique de convergence 5 interposées entre ladite caméra 6 et la cellule de détection,
- une source laser 7,
- des moyens optiques 8 qui sont montés sur un rail 9 et qui permettent de diriger le faisceau de la source 7 sur la cellule de détection 4.

Ainsi que l'illustre plus particulièrement la figure 2, la caméra CCD 6 observe la fluorescence des molécules excitées à l'intérieur des capillaires par le faisceau F laser selon un axe optique qui est parallèle à l'axe des capillaires C. La caméra CCD 6 collecte la lumière de fluorescence en provenance directe des molécules excitées, laquelle lumière forme un cône autour de l'axe dudit capillaire suivant l'angle solide entre la position des molécules excitées dans le capillaire et l'ouverture dudit capillaire.

Dès lors que la résolution de la caméra est suffisante, ceci permet de distinguer la lumière qui émerge de l'intérieur des capillaires C de celle venant des parois de ceux-ci et/ou du milieu qui les entoure. Il en résulte une amélioration considérable du rapport signal sur bruit.

Par exemple, dans le cas de capillaires C de 100 μm de diamètre intérieur et de 300 μm de diamètre externe, on peut utiliser comme détecteur une caméra CCD 6 permettant, en combinaison avec les moyens optiques 5, une résolution de l'ordre de 20 μm .

Egalement, pour minimiser le bruit de fond venant de la diffusion du faisceau F laser ou de la fluorescence des parois des capillaires C ou du milieu environnant, un cache noir formant diaphragme est avantageusement monté en sortie des capillaires C.

On notera qu'étant donné que l'observation de la fluorescence des molécules se fait en sortie des capillaires C selon un axe parallèle à la direction des capillaires C, il devient possible d'utiliser des matrices de capillaires C, ce qui permet de multiplier considérablement le rendement d'électrophorèse. Le terme matrice doit être entendu de façon générale et désigne tout ensemble de capillaires C dans lequel ceux-ci sont répartis en étant superposés les uns aux autres selon deux directions. Ce terme englobe par conséquent tout aussi bien des matrices constituées de plusieurs barrettes superposées que d'autres dispositions de capillaires et notamment par exemple des ensembles dans lesquels les capillaires sont répartis en quinconce.

Le nombre de capillaires par matrice peut être très variable. Des essais ont été réalisés sur des matrices de 16, 50 et 100 capillaires. Un nombre supérieur de capillaires par matrice pourrait également être envisagé.

Le faisceau F d'excitation émis par la source laser 7 est envoyé sur la cellule de détection 4, pour attaquer les capillaires C perpendiculairement à la direction selon laquelle ils s'étendent.

Le faisceau F d'excitation peut alors être soit de section circulaire (figures 3a et 3b), auquel cas il est envoyé dans le plan d'une barrette de capillaires C pour traverser successivement ces derniers.

Avantageusement également, il peut être allongé (par exemple elliptique) et attaquer une barrette selon une direction optique perpendiculaire au plan de ladite barrette, ce qui permet à un même faisceau F d'attaquer simultanément les différents capillaires C superposés (figures 4a et 4b). En outre, cela permet une plus grande tolérance sur la position relative des capillaires.

Et ainsi que l'illustre la figure 5, on utilisera avantageusement un faisceau F elliptique dans le cas où les capillaires C sont répartis non pas selon une barrette, mais selon une matrice.

Les capillaires C peuvent être maintenus entre eux par collage et/ou par des pré-formes.

Par ailleurs, ainsi que l'illustre la figure 6a, il peut être prévu sur la trajectoire du faisceau d'excitation, dans les interstices entre les capillaires C un matériau dont l'indice de réfraction est choisi pour que le faisceau d'excitation ne diverge pas après avoir été traversé par un capillaire, notamment un matériau dont l'indice est inférieur à celui des capillaires.

Ce matériau est choisi aussi transparent que possible et non fluorescent.

L'effet de focalisation obtenu avec un tel matériau est illustré par les photographies reprises sur les figures 7a et 7b. On voit sur ces photographies qu'un faisceau F éclairant plusieurs capillaires C en parallèle crée des zones d'ombres après le passage à travers les capillaires C quand les indices des capillaires C et du milieu environnant sont proches, mais que la lumière transmise est focalisée lorsque l'indice extérieur est inférieur à celui des capillaires C. Ainsi, la lumière en sortie de chacun des capillaires se trouve focalisée sur le capillaire de la rangée suivante, qui est directement en regard.

Cette focalisation multiple permet par exemple d'utiliser un même faisceau F elliptique pour éclairer différentes rangées de capillaires C.

Cet effet de focalisation permet aussi l'utilisation d'une manière avantageuse du faisceau laser. Quasiment la totalité de son intensité est focalisée dans les différents capillaires.

Une telle focalisation est réalisable avec un réseau de capillaires ou encore plus parfaitement par des micro lentilles. Elle diminue d'au moins un facteur 3 la puissance du laser nécessaire, créant en même temps moins de bruit.

Le matériau qui assure la fonction de focalisation peut éventuellement être constitué par le matériau qui sert à la fixation des capillaires. Toutefois, on préfère les solutions dans lesquelles on utilise, pour empêcher la divergence du faisceau d'excitation qui traverse les capillaires, un matériau différent de celui qui assure la fixation des capillaires.

On notera d'ailleurs, ainsi que l'illustre la figure 7b, que dans ce cas, le matériau qui empêche la divergence du faisceau d'excitation peut être constitué par la solution tampon dans laquelle les capillaires baignent.

On donne ci-après des détails techniques relatifs au montage qui est
5 illustré sur la figure 1 qui a été utilisé par les inventeurs.

L'électrode dans la boîte 2 est alimentée par un générateur de tension commercialisé par la société SPELLMAN.

Les entrées et sorties des capillaires C sont électriquement reliées par l'intermédiaire d'un tampon ou d'une solution de polymère à la cathode
10 et à l'anode de ce générateur.

L'anode se trouvant à la masse, la tension appliquée sur la cathode peut aller jusqu'à 30 kV pour une longueur de capillaires C entre 15 et 60cm.

La cellule de détection 4 où débouchent les capillaires C est un parallélépipède rectangle aux parois opaques muni de deux fenêtres
15 latérales en quartz pour l'entrée et la sortie du faisceau F laser, tandis qu'une autre fenêtre, également en quartz, se trouve dans l'axe des capillaires C pour permettre la collection de la lumière de fluorescence par l'optique 5 et la caméra 6.

Cette dernière fenêtre peut être remplacée par un filtre pour
20 discriminer la lumière de fluorescence de la lumière laser. En variante, ce filtre peut être disposé en sortie de ladite fenêtre.

Une quatrième fenêtre, sur la paroi supérieure de la cellule permet d'observer avec un microscope l'alignement du faisceau F laser par rapport aux capillaires C.

25 La colle qui est utilisée pour fixer les capillaires C dans la cellule de détection est une colle transparente qui polymérise aux UV.

L'optique 5 est un objectif qui présente une focale de 1,2. Elle est avantageusement complétée par deux bonnettes avec un total de 6 dioptries, pour obtenir un agrandissement proche de 1.

30 Alternativement, l'optique 5 peut consister en deux objectifs dont le premier est inversé. Entre les deux objectifs, on monte avantageusement un système de dispersion multicolore.

En variante encore, l'optique 5 peut avantageusement intégrer un réseau de fibres optiques interposé entre les sorties des capillaires et la caméra CCD.

La caméra CCD 6 est du type de celles commercialisées par PRINCETON sous la dénomination "frame transfer". Elle permet de réaliser des acquisitions successives sans temps mort et sans obturateur mécanique.

La surface active de la caméra est de 6 à 8 mm² avec une taille de pixels de 22 µm/22µm.

10 La caméra est refroidie par effet Peltier jusqu'à -40° C environ.

Le laser est un laser argon (ILT) présentant une puissance maximale d'environ 100 mW à la longueur d'ondes de 488 nm.

Un prisme holographique permet d'éliminer toute longueur d'ondes autre cette longueur d'ondes de 488 nm.

15 La matrice de séparation (gel ou autre) est injectée dans les capillaires au moyen d'une pompe qui permet d'appliquer une pression dans la cuvette de détection.

On présente ci-après les résultats qui ont été obtenus avec un tel système pour une puissance de faisceau F laser de 40 mW et une distance
20 entre les tranches de sortie des capillaires C et le point d'impact du faisceau F d'excitation de détection de 750 µm, en injectant, par voie électrocinétique ou avec un flux hydrodynamique des dilutions d'oligonucléotides d'une concentration connue.

La figure 8 donne, en fonction de la concentration de fluorescéine sulfate injectée, le nombre de charges collectées sur 25 pixels (somme-
25 par le logiciel). On constate une bonne linéarité dans la région représentée qui a été vérifiée entre 0.05 et 100 nmol/l. Les deux droites correspondent aux charges collectées pour un capillaire central et un au bord de la rangée, respectivement. La différence s'explique par la distribution gaussienne du
30 faisceau laser (classiquement elliptique).

En ce qui concerne la sensibilité minimale détectable, la figure 9 donne, en fonction du numéro de capillaire, le rapport signal/bruit (S/N)

obtenu pour la concentration d'1 nmol/l de fluorescéine. On observe un rapport signal/bruit supérieur à 50. Même vu du bord, ce rapport est largement satisfaisant pour des expériences de séquençage ou de génotypage.

5 Pour améliorer encore la sensibilité, on peut utiliser des pixels plus gros, par exemple regroupant les 25 pixels précédemment envisagés. On obtient alors une sensibilité environ trois – cinq fois plus élevée. Ceci vient du fait que le bruit de lecture de la caméra est presque 25 fois plus élevé si on lit 25 pixels individuellement, que s'ils sont regroupés en un seul pixel.

10 Comme on peut l'observer dans la figure 10, il est également possible de gagner en sensibilité en augmentant simplement la puissance du laser. Ceci montre que le système n'est pas à sa limite.

 La dépendance de la lumière récoltée en fonction de l'ouverture de l'objectif a également été testée. Le rapport signal/bruit est donné pour trois
15 ouvertures différentes de l'objectif de la figure 11.

 Par ailleurs, les tests mis en œuvre par les inventeurs ont montré que la sensibilité du système dépendait également de la position du point d'impact du laser par rapport à la sortie des capillaires C. Toutefois, celle-ci varie peu lorsque l'on fait varier la distance entre ledit point d'impact et la
20 sortie de 2 mm à 250 μ m, ce qui confirme que l'essentiel de la lumière sortant par l'ouverture des capillaires C est effectivement collecté. Pour gagner encore en sensibilité, il faudrait alors s'approcher considérablement avec le faisceau F de la sortie des capillaires C. Un tel gain entraînerait une plus faible collimation de la lumière, ce qui dégraderait partiellement la
25 résolution de l'image.

 Pour montrer la capacité du système à séparer des bandes, les inventeurs ont fait un test de migration avec l'échantillon double brin (ϕ X174 de Gibco BRL) dans une solution de polymères (HPC 0,5%). Le marqueur utilisé était l'intercalaire SYBR(I) (Molecular Probes). Le résultat a
30 été porté sur le graphe de la figure 12a pour deux capillaires C. Pour une concentration d'1 ng/ μ l, les inventeurs ont obtenu une bonne séparation des bandes et un bon rapport signal sur bruit.

Les inventeurs ont également fait des tests de séparation avec un échantillon d'ADN (M13) d'une réaction de séquence (T-terminator kit d'AMERSHAM, primer marqué avec FITC de PHARMACIA) dans une solution de polymère (T15, 5%, de l'INSTITUT CURIE) à 55°C (figure 12b).

- 5 La figure illustre la qualité de séparation, le bon rapport signal sur bruit ainsi que la vitesse de séparation (600 bases dans 1h).

D'autres variantes que celle qui vient d'être décrite sont bien entendu envisageables. Notamment, les faisceaux de lumière de fluorescence en sortie des capillaires C – qui sont collimatés – peuvent être directement
10 transmis à un ou plusieurs prismes intermédiaires ou encore à un réseau de diffraction, pour séparer spatialement les différentes longueurs d'ondes émises et envoyer celles-ci sur un réseau de photodiodes.

Comme on l'aura compris, les systèmes qui viennent d'être décrits sont d'une conception simple et permettent d'atteindre des hauts débits
15 avec une grande fiabilité et une grande facilité de mise en œuvre.

REVENDICATIONS

1. Système d'électrophorèse multicapillaire comportant une pluralité de
5 capillaires juxtaposés, au moins une source pour l'émission d'un faisceau destiné à exciter des molécules se trouvant sur son trajet et à l'intérieur des capillaires, des moyens pour détecter la fluorescence des molécules excitées par ledit faisceau, caractérisé en ce que lesdits moyens sont agencés de façon à réaliser une détection de la lumière qui
10 émerge en sortie desdits capillaires et qui se propage selon la direction dans laquelle lesdits capillaires s'étendent et en ce que la résolution des moyens de détection est suffisante pour distinguer la lumière qui émerge en sortie des capillaires de celle venant des parois de ceux-ci et/ou du milieu qui les entoure.
- 15 2. Système selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il comporte une matrice de capillaires.
3. Système selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce que le faisceau d'excitation est de section allongée et attaque simultanément plusieurs capillaires superposés.
- 20 4. Système selon la revendication 3, caractérisé en ce qu'il comporte des moyens, tels que des microlentilles, pour réaliser une focalisation multiple sur une barrette de capillaires.
5. Système selon l'une des revendications 3 ou 4, caractérisé en ce qu'une barrette de capillaires réalise une focalisation multiple en entrée de la
25 barrette suivante.
6. Système selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce que l'espace entre les capillaires est rempli, au moins sur la trajectoire du faisceau d'excitation, par un matériau dont l'indice de réfraction est choisi pour que le faisceau d'excitation ne diverge pas après avoir
30 traversé un capillaire.
7. Système selon la revendication 4, caractérisé en ce que ledit matériau est transparent et non fluorescent.

8. Système selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'il comporte des moyens pour appliquer dans la cuvette de détection, une pression qui permet de remplir les capillaires avec la matrice de séparation.
- 5 9. Système selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'il comporte des moyens de dispersion pour séparer spatialement les différentes longueurs d'onde de fluorescence.
10. Système selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce que les moyens de détection relèvent une image complète de la lumière en sortie des capillaires.
- 10 11. Système selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce que les moyens de détection comportent des moyens de détection du type à transfert de charge (CCD), ainsi que des moyens de focalisation.
- 15 12. Système selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce que les moyens de détection comportent des moyens de détection du type à transfert de charge (CCD), ainsi qu'un faisceau de fibres interposé entre les sorties des capillaires et les moyens de détection du type à transfert de charge.

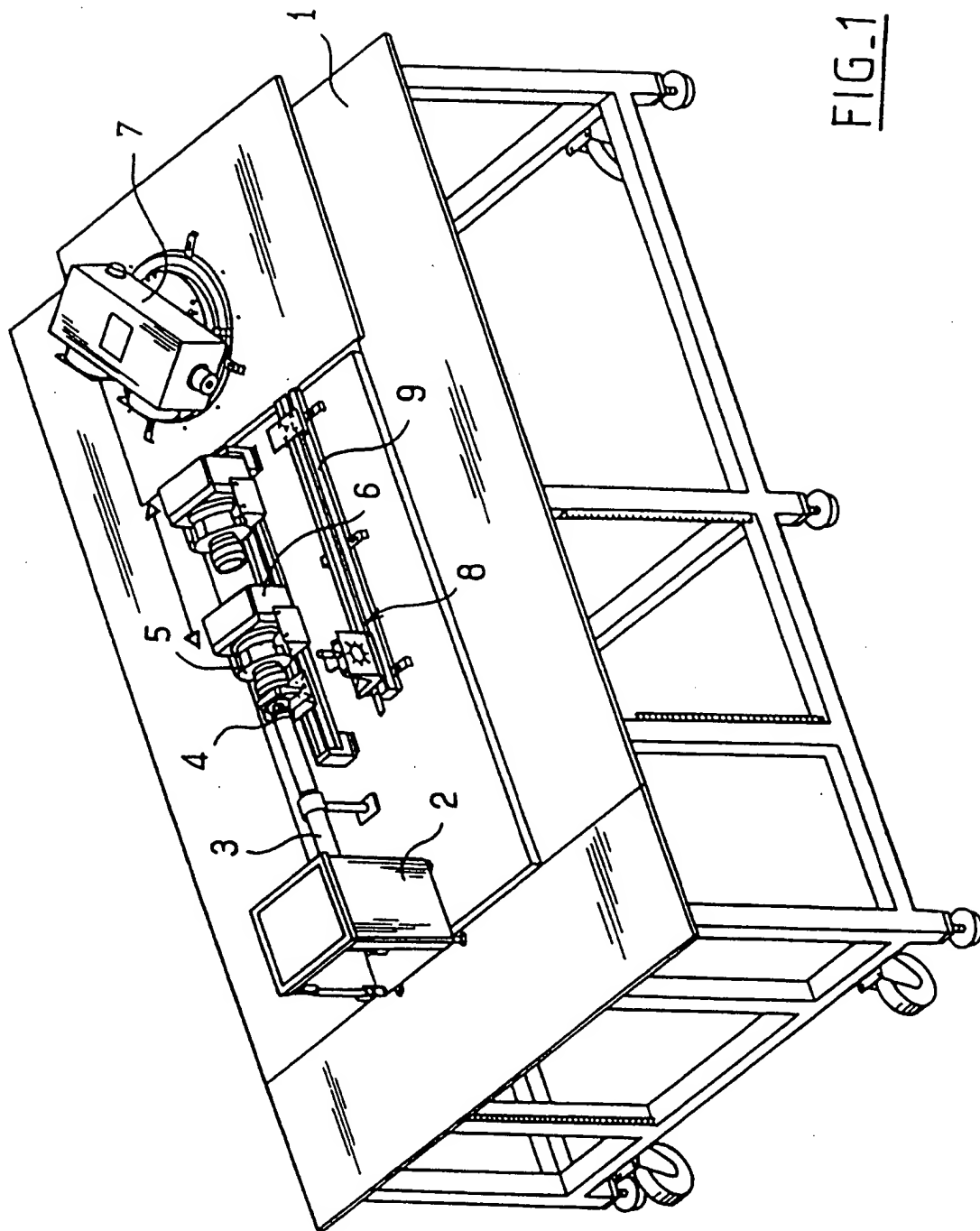
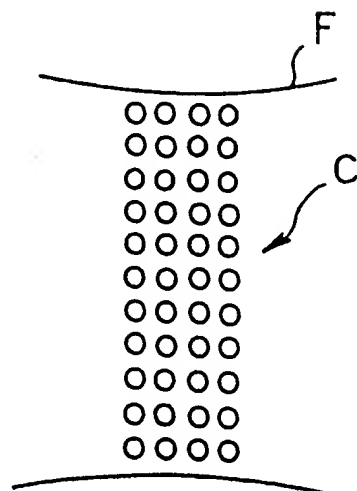
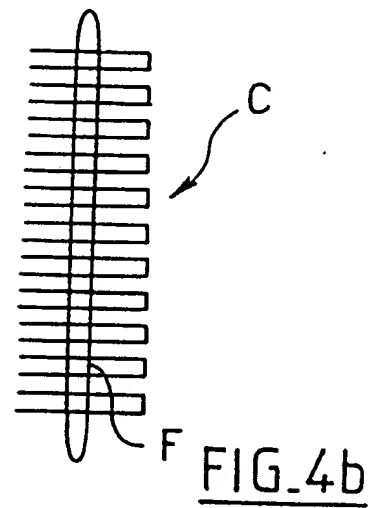
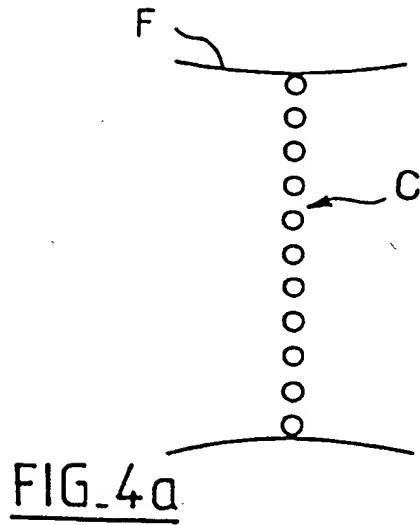
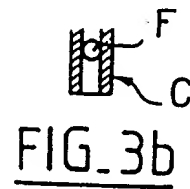
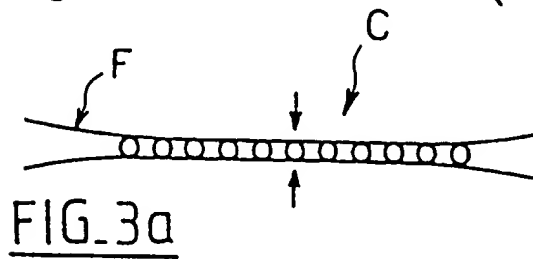
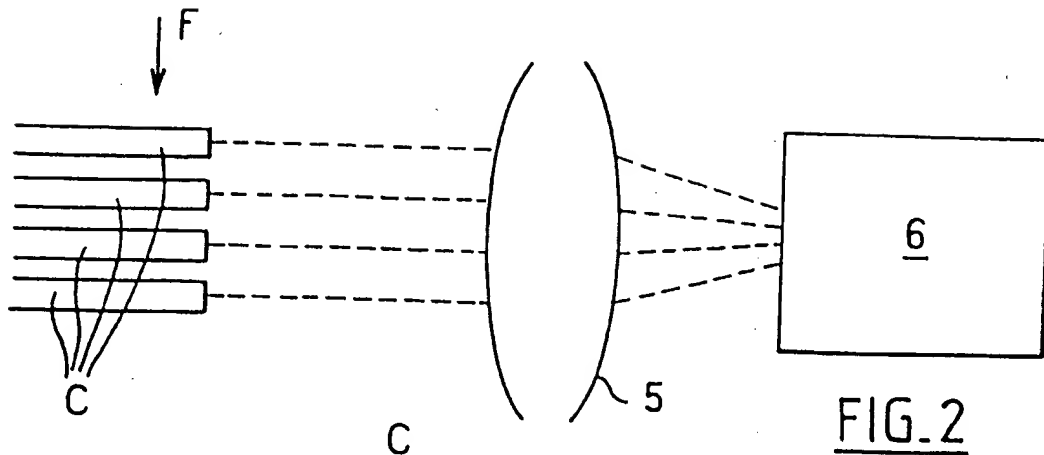


FIG. 1

2 / 9



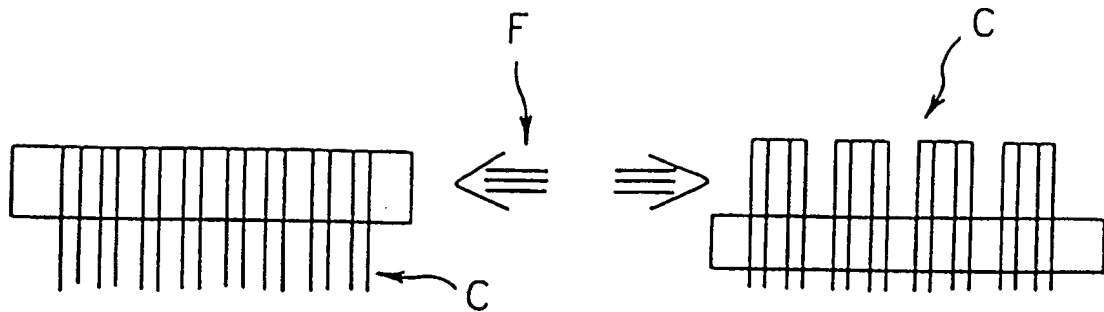


FIG. 6a

FIG. 6b

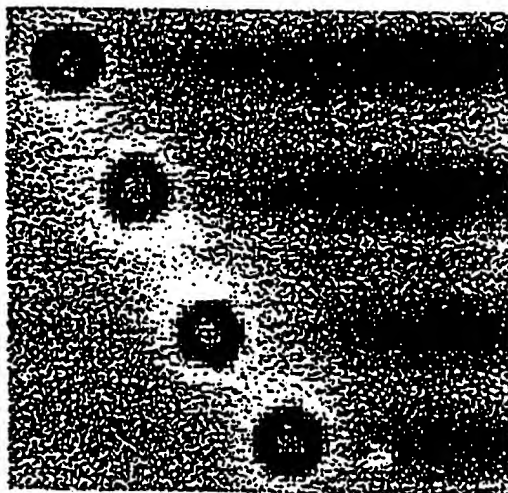


FIG. 7a

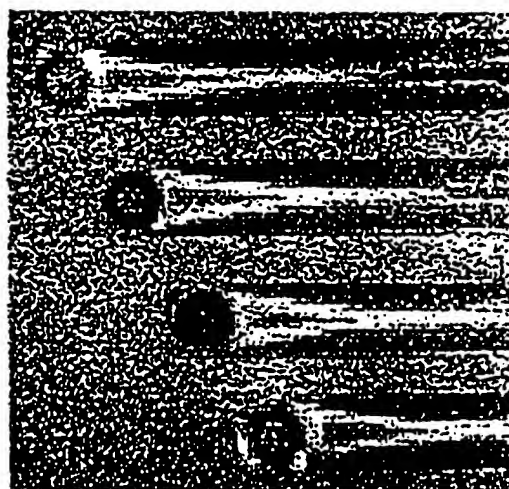
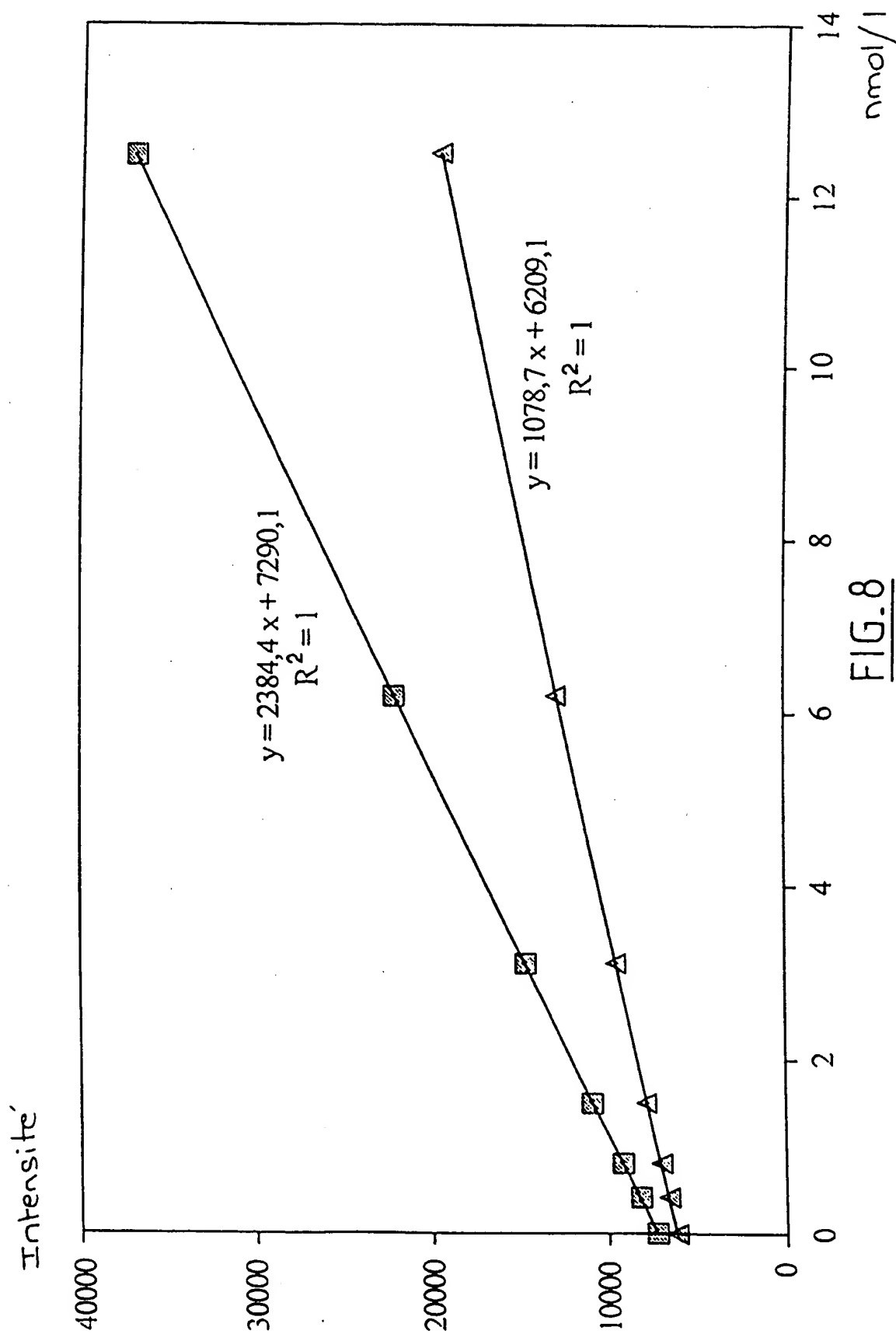
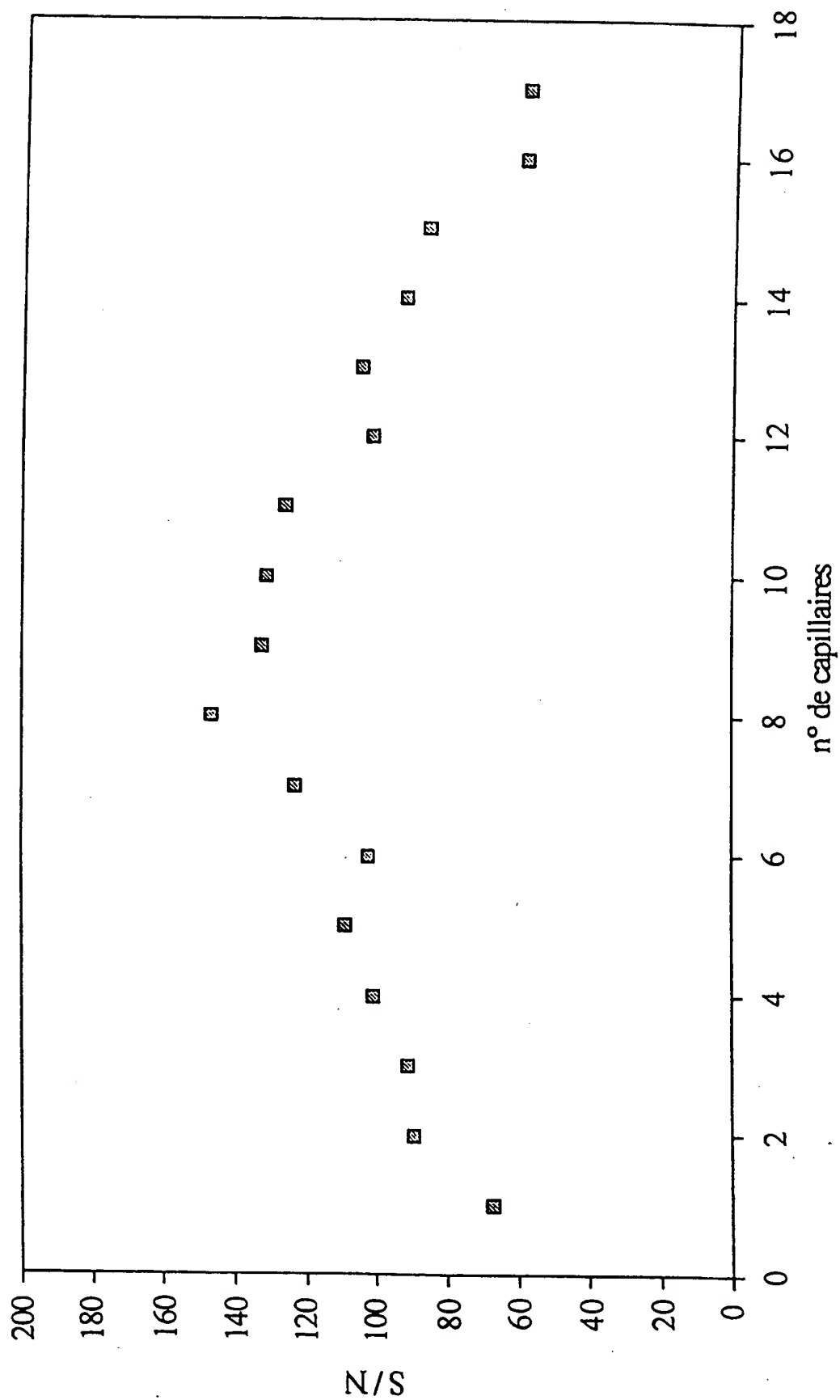


FIG. 7b

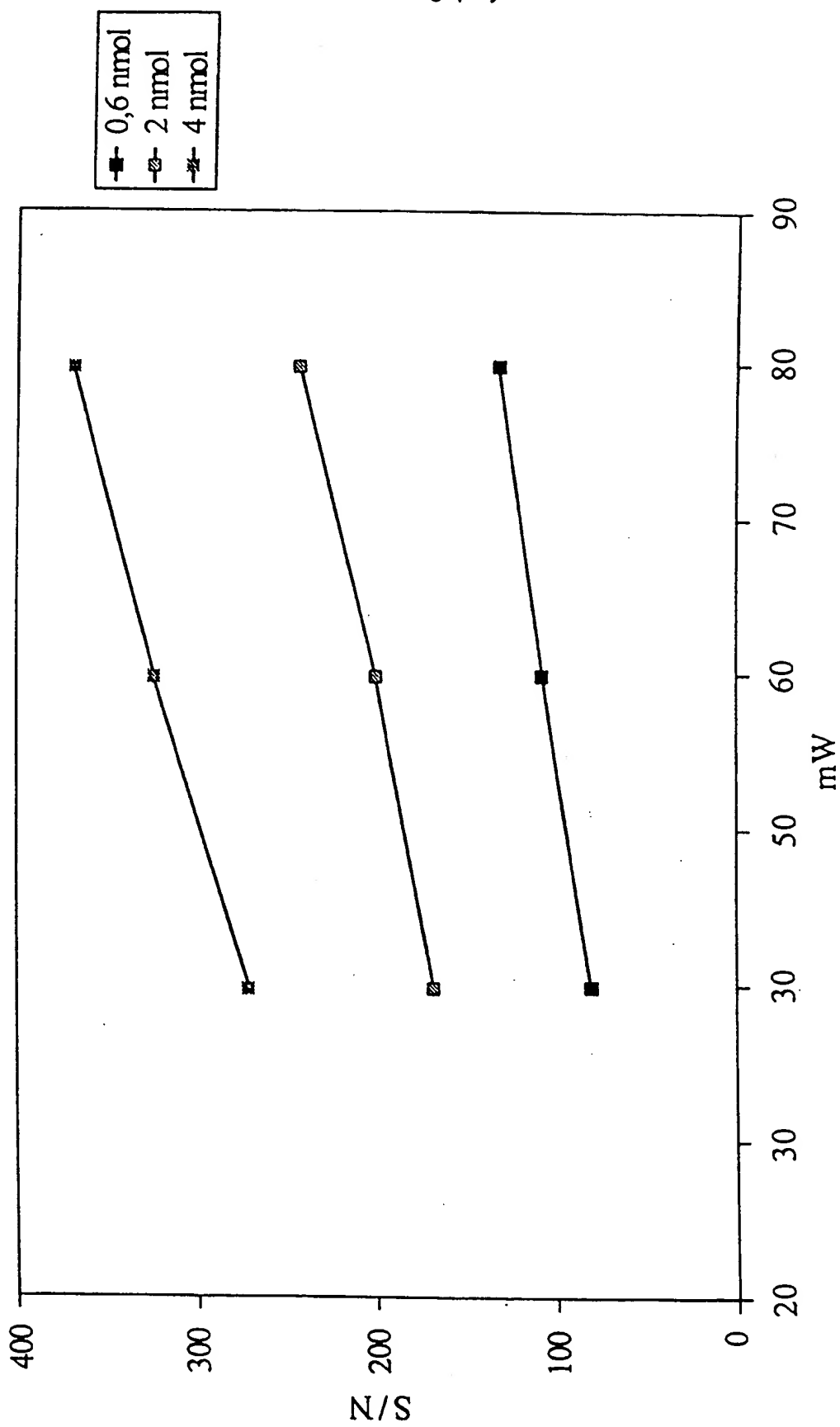
4 / 9



5 / 9

FIG. 9

6 / 9

FIG. 10

7 / 9

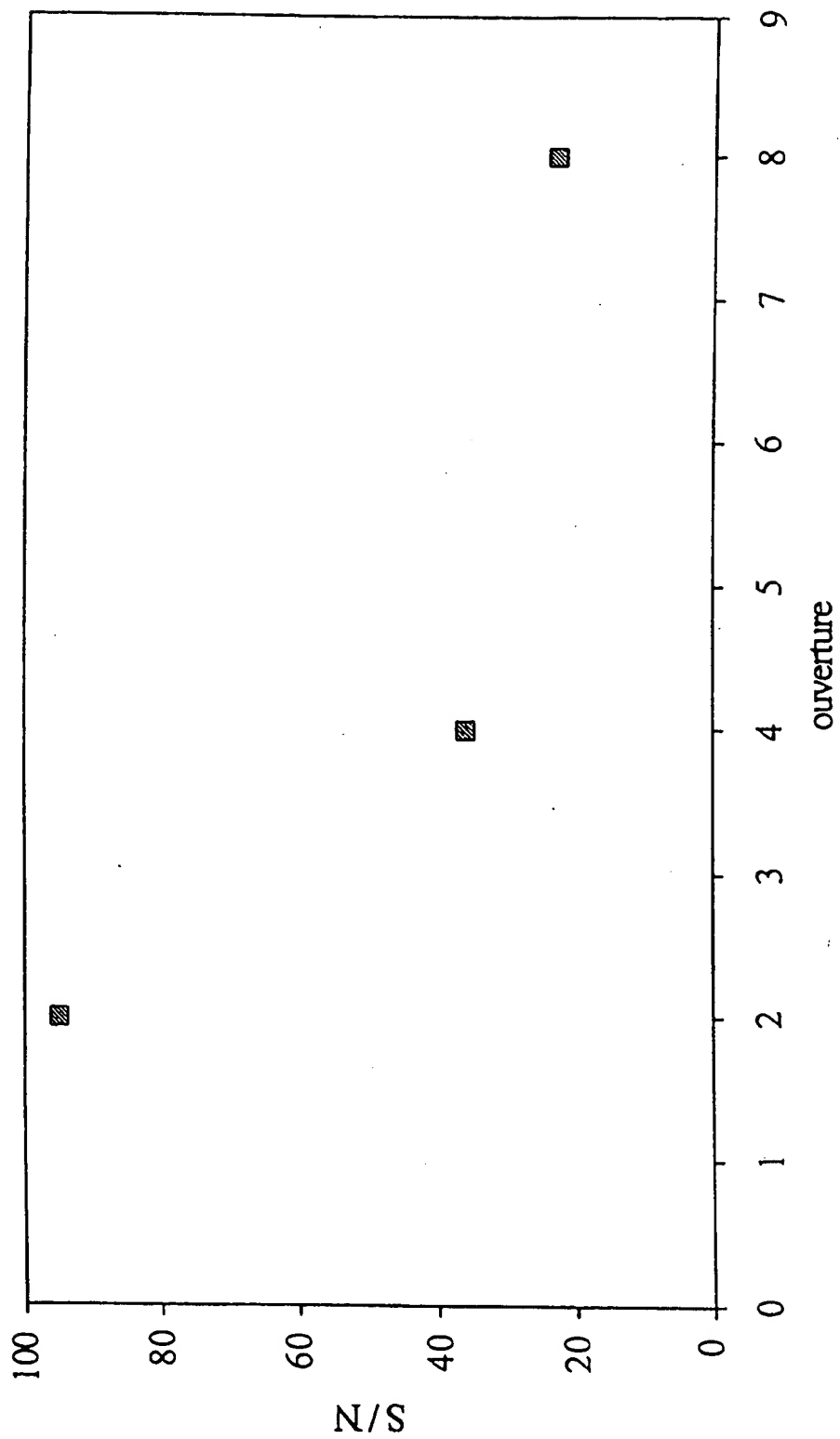
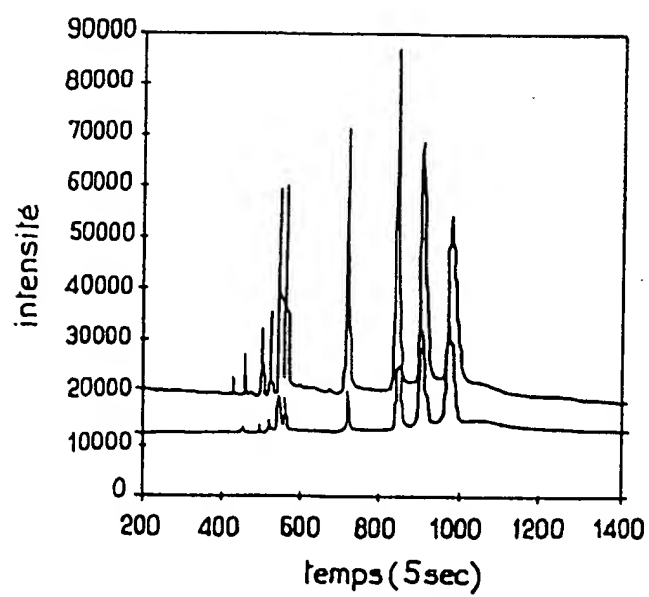


FIG. 11

FIG.12a

